



TITLE:

Development of novel affinity-guided catalysts for specific labeling of endogenous proteins in living systems(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Song, Zhi-Ning

CITATION:

Song, Zhi-Ning. Development of novel affinity-guided catalysts for specific labeling of endogenous proteins in living systems. 京都大学, 2017, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2017-11-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20764>

RIGHT:

許諾条件により要旨は2018-01-01に公開; 許諾条件により本文は2018-01-01に公開

京都大学	博士（工学）	氏名	宋 智凝
論文題目	Development of novel affinity-guided catalysts for specific labeling of endogenous proteins in living systems （生物環境における触媒反応による内在性蛋白質の特異的なラベル化法の開発）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>生体内では多種多様な生体分子が複雑に相互作用し合い、その結果極めて高次の生命現象を発現する。中でもタンパク質は、細胞骨格の形成、生体情報の伝達、化学反応の触媒など生命活動に必須な役割の大半を司ることから、生体高分子の主役として位置づけられる。タンパク質の化学修飾は、生命現象解明するための分子ツールを創り出すことのできる強力な手法である。蛍光色素や機能性分子を細胞内、組織内に存在する標的タンパク質に選択的に導入できれば、タンパク質の機能を解析・制御する上で有用であると考えられる。しかし、細胞内や組織内のように様々なタンパク質や生体分子が存在する生体夾雑系で標的タンパク質のみを選択的に化学修飾することは困難であった。申請者は博士課程研究において、有機触媒を利用した細胞内または組織内の標的タンパク質に対する特異的化学修飾法の開発と、その手法を応用したタンパク質イメージング及び動的挙動解析を行った。本論文はこれらの研究結果についてまとめたものであり、三章から構成される。</p> <p>第1章では、細胞内において標的タンパク質を選択的に化学修飾するための手法として最近我々が開発したアフィニティー駆動型 DMAP 触媒反応法（Affinity-Guided DMAP Catalyst (AGD chemistry)）の改善を行った。本手法はタンパク質に親和性を示すリガンドにアシル転移反応を加速する DMAP 触媒を連結した化合物と、チオエステル反応基にプローブを連結した Acyl Donor を用い、標的タンパク質を特異的にラベル化することができる。これまでにこの AGD chemistry を用いて、細胞膜表層のタンパク質への特異的なラベル化に成功していたが、Acyl Donor の反応性が高すぎるため、細胞内では多くの非特異反応が進行し、標的タンパク質を特異的にラベル化することは困難であった。そこで申請者は、Acyl Donor の反応性は脱離基の pKa により制御可能であると考え、様々な構造を有するチオエステル誘導体を開発した。その結果、これらチオエステル型 Acyl Donor の反応性は脱離基の pKa とよい相関を示し、適切な反応性を有する Acyl Donor を見出すことに成功した、この最適化した Acyl Donor を用いて HeLa 生細胞内に内在する FKBP12 のラベル化を行ったところ、従来検出されていた非特異反応が大幅に抑えられ、FKBP12 に対する特異的なラベル化が進行することを確認した。さらに Acyl Donor の細胞内局在の改善と洗浄除去能を向上させることにより生細胞内 FKBP12 のイメージングにも成功した。</p> <p>第2章では、AGD chemistry と異なる新規アフィニティー駆動型 oxime 触媒反応法（Affinity-guided oxime chemistry (AGOX chemistry)）を開発した。本手法では、触媒基として中性 pH で高い求核性を有する pyridinium oxime (PyOx)、Acyl Donor には N-acyl-N-alkylsulfonamide (NASA)を新たに採用した。生体に存在しない分子骨格で、且つマイルドな求電子性を持つ NASA 型 Acyl Donor は優れたエステラーゼ耐性を示し、求核性の高い PyOx 触媒によって活性化されることを確認した。また、AGOX chemistry では、中性 pH 領域で効率よく標的タンパク質の特異的なラベル化反応が</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	宋 智凝
<p>進行することを試験管内精製タンパク質 FKBP12 と CA2 (carbonic anhydrase 2)のラベル化実験により明らかにした。この AGOX chemistry を用いて、生細胞表層に局在する内在性タンパク質 CA12 (carbonic anhydrase 12)及び FR (Folate receptor)のラベル化を行うと、AGD chemistry に比べ非特異反応が抑えられ、効率よく標的タンパク質のラベル化が進行した。さらに、高効率にラベル化が進行したことにより、FRAP(Fluorescent Recovery After Photobleaching)実験が可能となり、内在性細胞膜タンパク質 CA12 及び FR の生細胞膜中での拡散速度の算出に初めて成功した。以上より、新規 AGOX chemistry が一般性・有用性の高いタンパク質化学修飾法であることを実証した。</p> <p>第3章では、AGOX chemistry を用いて、培養細胞よりもさらに分子夾雑な環境である生きた脳組織における内在性タンパク質のラベル化を行った。ターゲットタンパク質として α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)型グルタミン酸受容体 (AMPA)を選択した。AMPA と認識するリガンド PFQX (6-pyrrolyl-7-trifluoro-methyl-quinoxaline-2,3-dione)に二つの PyOx を連結した化合物と、fluorescein 型 NASA Acyl Donor を用いて、まずは HEK293T 細胞における AMPAR 強制発現系でのラベル化を行い、選択的なラベル化反応の進行を確認した。続いて、培養細胞より分子夾雑なマウスの海馬、小脳スライス中に内在的に発現している AMPAR のラベル化を試みた。その結果、AGOX chemistry を用いることで、従来の AGD chemitry では達成できなかった脳組織内在性の AMPAR の選択的なラベル化に成功した。本研究は触媒的タンパク質化学修飾を生体組織中で行った世界初の例であり、汎用性の高い内在性タンパク質解析手法として更なる進展が期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、生細胞や組織環境のような分子夾雑系において標的内在性タンパク質を特異的にラベル化する方法の開発と、その手法を応用したタンパク質イメージング及び動的挙動解析の成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 細胞内において標的タンパク質を選択的に化学修飾するための手法として近年開発されたアフィニティー駆動型 DMAP 触媒法 (Affinity-Guided DMAP Catalyst (AGD chemistry) の改善を行った。申請者はチオエステル型 Acyl Donor の反応性を脱離基の pKa により制御し、適切な反応性を有する Acyl Donor を合理的に設計した。新しく開発された Acyl Donor によって、標的以外のタンパク質に対する非特異反応が抑えられ、細胞内在性 FKBP12 の特異的なラベル化に成功した。さらに Acyl Donor の親水性を向上させることにより、FKBP12 のライブセルイメージングも達成した。
2. 中性 pH でも高い求核性を有する pyridinium oxime (PyOx) 触媒と、エステラーゼに耐性を示す *N*-acyl-*N*-alkylsulfonamide (NASA) 型 Acyl Donor による、新規アフィニティー駆動型 oxime 触媒反応法 (Affinity-guided oxime chemistry (AGOX chemistry)) の開発に成功した。AGOX chemistry は従来の AGD chemistry よりも選択的、且つ効率よく標的タンパク質へのラベル化反応が進行することを明らかにした。また、細胞膜内在性タンパク質のラベル化および拡散速度の算出にも成功した。
3. 生体環境での安定性、タンパク質ラベリングの選択性が向上した AGoX chemistry を用いて、培養細胞よりもさらに分子夾雑な環境である脳組織スライスにおける内在性 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体の特異的なラベル化に成功した。

本論文は上記の通り、細胞内および組織内環境に存在する内在性タンパク質の選択的な化学修飾法の開発およびそれを利用したタンパク質の動的挙動解析を行ったものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 29 年 10 月 25 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。